

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000093

International filing date: 14 January 2005 (14.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0400366
Filing date: 15 January 2004 (15.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 March 2005 (30.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

20 JAN. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

1er dépôt

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

REMISE DES PIÈCES		Réserve à l'INPI	Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire			
DATE		15 JAN 2004			DB 540 W /260899	
LIEU		75 INPI PARIS 26Bis SP				
N° D'ENREGISTREMENT		0400366				
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI						
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		15 JAN. 2004				
Vos références pour ce dossier (facultatif) IFB 03 DH INR ORUS						
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie						
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes				
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>				
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>				
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>				
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date	/	/	
		N°	Date	/	/	
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/>	N°	Date	/	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)						
PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE <i>P. CINNABARINUS</i>						
4 DECLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»				
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE				
Nom ou dénomination sociale						
Prénoms						
Forme juridique						
N° SIREN						
Code APE-NAF						
Adresse	Rue					147, rue de l'Université
Code postal et ville						
Pays		F-75338 PARIS CEDEX 07				
Nationalité		FRANCE				
N° de téléphone (facultatif)		FRANCAISE				
N° de télécopie (facultatif)						
Adresse électronique (facultatif)						

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES	
DATE	15 JAN 2004
LIEU	75 INPI PARIS 26Bis SP
N° D'ENREGISTREMENT	0400366
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Réervé à l'INPI

08 540 W / 190600

Vos références pour ce dossier : (facultatif)		IFB 03 DH INR ORUS
6 MANDATAIRE Nom DEMACHY Prénom Charles Cabinet ou Société GROSSET-FOURNIER & DEMACHY N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse 54, rue Saint-Lazare Rue 75009 PARIS Code postal et ville N° de téléphone (facultatif) 01.42.81.09.58 N° de télécopie (facultatif) 01.42.81.08.71 Adresse électronique (facultatif)		
7 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée		
8 RAPPORT DE RECHERCHE Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) Établissement immédiat <input checked="" type="checkbox"/> ou établissement différé <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Avec en-tête du demandeur) Charles DEMACHY Mandataire IFB 03 DH		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE
DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE *P.
CINNABARINUS*

5

La présente invention concerne l'utilisation de souches monocaryotiques de champignons filamentueux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, pour la mise en œuvre d'un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine dans la souche monocaryotique susmentionnée de *Pycnoporus*.

10 A l'heure actuelle, deux modèles fongiques sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels dans le cadre de la production d'enzymes intervenant dans les biotransformations végétales, telles que les métalloenzymes. Il s'agit d'*Aspergillus*, et de *Trichoderma*, qui appartiennent au groupe des deutéromycètes. Toutefois, les rendements de production à l'aide de ces modèles, notamment en production de laccases, n'excèdent pas les 150 mg/l.

15 La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que la transformation de souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* déficientes pour l'activité laccase à l'aide de vecteurs contenant le gène codant pour cette laccase et dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur identique au promoteur *pLac* endogène de la laccase de *P. cinnabarinus*, conduit à une production équivalente de laccase que lors de la mise en œuvre d'un procédé de surproduction de laccase par induction du promoteur endogène de cette laccase par action de l'éthanol sur des souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* non déficientes pour l'activité laccase, et qui égale 20 le g/l.

25 Des résultats similaires ont été obtenus par les Inventeurs en utilisant le promoteur *gpd*, et le promoteur *sc3* de *Schizophyllum commune*, en lieu et place du promoteur *pLac* susmentionné.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamentueux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et à l'aide d'un vecteur.

100% 100% 100% 100% 100% 100% 100% 100% 100% 100%

contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,

5 - le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée, est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différencierées appelées basides, au sein desquels a alors lieu la caryogamie (fusion des noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendre un mycélium monocaryotique.

Avantageusement, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée dans le procédé susmentionné de l'invention, est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Les protéines recombinantes déterminées surexprimées dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, correspondent soit à des protéines endogènes de *Pycnoporus*, soit à des protéines exogènes différentes des protéines endogènes de *Pycnoporus*. Notamment ces protéines exogènes correspondent à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que les protéines les protéines recombinantes déterminées correspondent aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

30 - les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase.

Avantageusement, dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, la souche

monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, afin de ne pas avoir à séparer la protéine recombinante déterminée de la protéine endogène à laquelle elle correspond lors de la purification de ladite protéine recombinante.

5 En variante, toujours dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée peut ne pas être déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, ladite souche étant alors transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée afin de la distinguer de la protéine endogène lors de l'étape de purification. A titre d'illustration, la protéine recombinante déterminée peut être marquée par une étiquette histidine (His-tag).

10 A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

15 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle 20 d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,

25 - une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféïque et les lignosulfonates,

30 - la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., Herpoel I., Frasse P., Moukha S., Lesage-Meessen L., Asther M. 1990 : Laccase production by a monocaryotic strain *Pycnoporus cinnabarinus* derived from a dikaryotic strain : World Journal of Microbiology and Biotechnology 15, 401-414.

Pycnoporus cinnabarinus représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de

5 *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

10 - une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus* dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

20 * le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

25 * ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

30 - la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de la laccase correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène gpd ou sc3,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention a également pour objet la séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

L'invention concerne également tout vecteur d'expression, tel que le plasmide pELP, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* susmentionné, ou une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* susmentionné, ou d'une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant à une protéine endogène de *Pycnoporus* choisie parmi les suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
- ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou
l' α -amylase.

L'invention concerne également toute cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute cellule hôte susmentionnée, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation de vecteurs d'expression tels que définis ci-dessus, ou de cellules hôtes susmentionnées, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée telle que définie ci-dessus.

10 L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du SEPC : Système d'Expression *Pycnoporus cinnabarinus*, à savoir du développement d'un modèle d'expression fongique performant permettant de s'affranchir des modèles industriels utilisés actuellement par les grands groupes européens (*Aspergillus* et *Trichoderma*).

15 En résumé, il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus spécifiquement de champignon filamenteux du groupe basidiomycète, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui a été développé par les Inventeurs pour la surexpression de protéines d'intérêt industriel. Ce travail a été fait dans le cadre de l'étude de métalloenzymes, telles que les laccases, et en particulier a permis de cloner les gènes impliqués pour leur surexpression, et de surproduction des laccases en grande quantité à l'aide de fermenteurs, ceci afin de les utiliser dans des applications industrielles à usage alimentaire (panification, préparation de boissons afin de moduler la couleur du thé, aider à la clarification des jus de fruits et des boissons alcoolisées, formation d'agropolymères) et non alimentaire (traitement des « jeans », dégradation de polluants aromatiques dans les sols, bioblanchiment des fibres lignocellulosiques dans le domaine des pâtes à papier).

25 **I) Obtention de lignées monocaryotiques de *Pycnoporus cinnabarinus* pour la transformation du champignon et la surproduction de gènes d'intérêt.**

30 Cette étape a pour but d'isoler puis de sélectionner des lignées cellulaires haploïdes issues des spores sexuées d'un champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui seront utilisées en temps qu'hôte pour l'expression des gènes d'intérêt. *P. cinnabarinus* est un champignon hétérothallique qui se trouve à l'état sauvage sous forme dicaryotique (deux noyaux non appariés par cellule) à partir duquel des lignées monocaryotiques sont sélectionnées (un noyau par cellule), potentiellement plus stable et donc utilisable pour la transformation génétique. Dans le cadre de cette

étude les Inventeurs se sont attachés à sélectionner de lignées monocaryotiques déficientes pour l'activité laccase (lac'). A l'état dicaryotique, le champignon peut se multiplier par voie végétative (Fig. 1). Mais, sous l'influence de conditions environnementales particulières, on peut induire, en laboratoire, la formation d'organes de fructification. Au sein d'hyphes différencierées appelées basides, a alors lieu la caryogamie (fusion des noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes. Après germination, chaque basidiospore engendre un mycélium monocaryotique. Un simple test colorimétrique permet ensuite de ne sélectionner que les souches dépourvues d'activité laccase.

1) Isolement des souches monocaryotiques

Le milieu de fructification est composé d'extrait de malt 2% (P/V) et de l'agar (1,6% P/V). Les cultures sont ensemencées dans des boites de Pétri et gardées à 30°C dans le noir pendant 15 jours avant de les exposer au jour 2 à 3 semaines à température ambiante. Le corps de fructification apparaît orange-rouge. Les monospores sont alors récoltées avec de l'eau stérile sur le couvercle de la boite de Pétri. La suspension est diluée et mise en culture dans des boites de Pétri contenant un milieu MA2 (malt 2% P/V et agar 2% P/V) dans le but d'isoler des colonies. Des cultures pures isolées sont piquées et gardées dans du milieu MA2 à 30°C pendant 5 jours et stockées à 4°C.

Dans ces conditions, une souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase a été sélectionnée pour la transformation avec le vecteur d'expression dans le but de surexprimer le gène de la laccase. Une étude en Southern blot a été effectuée et a permis de démontrer que cette souche est déficiente pour le gène codant pour la laccase chez *P. cinnabarinus*.

2) Test rapide de détection de l'activité laccase des colonies monospores

Un morceau de mycélium est déposé dans une boite de Petri et recouvert d'une goutte de syringaldazine 0,1% (P/V) en solution éthanolique ; Après 15 minutes, un changement de couleur est observé. Le 2,2-azino-bis-[3-éthylthiazoline-6-sulfonate] (AETS) peut-être utilisé également comme substrat pour révéler une activité laccase.

3) Conditions de cultures pour produire la laccase

Un inoculum est prélevé des précultures qui ont poussé 10 jours à 30°C dans des fioles de Roux contenant 200 mL d'un milieu synthétique avec la composition suivante pour 1L : maltose (20 g), tartrate de diammonium (1,84 g), tartrate de disodium (2,3 g), KH₂PO₄ (1,33 g), CaCl₂, H₂O (0,1 g), MgSO₄, 7H₂O (0,5 g), FeSO₄, 7H₂O (0,07 g), ZnSO₄, 7H₂O (0,046 g), MnSO₄, H₂O (0,035 g), CuSO₄, 5H₂O (0,1 g), extrait de levure (1 g), solution de vitamines (1 mL/L) selon Tatum et al. (Biochemical mutant strains of *Neurospora* produced by physical and chemical treatment. American Journal of Botany, 37 : 38-46, 1950). Le mycélium de deux fioles est collecté, mélangé à 100 mL d'eau stérile et broyés au mixeur Ultraturax 60 sec. Pour produire de la laccase, le milieu synthétique est inoculé par 1 mL de la suspension de mycélium. Le milieu (100 mL) est ensuite incubé à 30°C dans des fioles erlenmeyer bafflées de 250 mL sous agitation (120 rpm).°

15 II) Clonage du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* et de son promoteur en vue de la construction d'un vecteur d'expression

Il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus particulièrement de champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, du groupe basidiomycète pour la surproduction de protéines recombinantes déterminées. Le modèle d'étude sélectionné est celui de la laccase de *P. cinnabarinus*. A l'heure actuelle, deux modèles fongiques sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels. Il s'agit d'*Aspergillus* et de *Trichoderma* qui appartiennent au groupe des Deutéromycètes. Ce système d'expression est donc tout à fait original et devrait combler la lacune concernant le développement de système d'expression basidiomycète compatible avec les exigences des industriels (possibilité de production à grande échelle de protéines sécrétées dans le milieu extra-cellulaire et culture du champignon producteur en fermenteur).

30 1) Clonage de gène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* et de son promoteur

Dans une première étape, les Inventeurs ont amplifié un fragment du gène codant pour la laccase à l'aide d'amorces nucléotidiques dégénérées (Fig. 2). Les amorces dégénérées amont F2 (SEQ ID NO : 6 ; CAYTGGCAYGGRTTCTTCC) et aval R8 (SEQ ID NO : 7 ; GAGRTGGAAGTCRATGTGRC) ont été déduites, respectivement,

des régions de liaison au cuivre I et IV des laccases d'organismes voisins et utilisées dans une réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* I-937. A 10 µl de mélange réactionnel sont ajoutés : 100 ng d'ADN génomique; 0.2 mM de dATP, dCTP, dTTP, and dGTP; 25 pmol de chaque amorce nucléotidique; 0.1 volume de tampon 10X *Pfu* polymerase (100 mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3) and 1 U de polymerase *Pfu*. Le mélange est chauffé à 94°C pendant 5 min avant d'ajouter la polymérase. Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 4 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 3 min. Une étape de 10 min à 72°C est effectuée afin de finir la réaction. Une bande de 1,64 kpb a été obtenue correspondant à la partie centrale du gène de la laccase. La séquence ADN a été clonée dans pGEM-T afin de séquencer cette partie du gène.

Par une technique de Southern blot (Fig. 3), nous avons défini les sites de restriction appropriés afin d'obtenir un fragment d'ADN minimum, pouvant contenir l'intégralité de gène de la laccase, et qui sont susceptibles de servir à amplifier les extrémités 5' et 3' manquantes. Un Southern blot a été effectué avec l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* avec les enzymes, *Bam*HII, *Eco*RI, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sma*I and *Xba* I et a permis de sélectionner *Pst*I qui donne une bande de 3.5 kpb par digestion de l'ADN génomique. Afin d'amplifier les parties manquantes du gène, une technique de PCR inverse a été utilisée avec un mélange de PCR contenant des amorces nucléotidiques spécifiques de la partie centrale précédemment isolée et de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus*. La réaction de PCR est effectuée avec 150 ng d'ADN coupé par *Pst*I et recircularisé sur lui-même par ligation et les amorces nucléotidiques Fex (SEQ ID NO : 8 ; GGATAACTACTGGATCCGCG) et Rex (SEQ ID NO : 9 ; CGCAGTATTGCGTGGAGAG). Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 5 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 4 min avec une étape finale de 10 min à 72 °C. Le fragment d'ADN amplifié correspond à une bande de 2,7 kpb qui a été cloné dans pGEM-T et séquencé.

L'intégralité du gène codant pour la laccase a été ensuite définie en combinant la partie centrale et les parties 5' et 3' amplifiées. Afin de vérifier cette séquence, le programme du gène a été comparé à celle de *P. cinnabarinus* I-937 avec les séquences nucléotidiques

P. cinnabarinus. Ce gène a été également cloné à partir de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* ss3 et s'est avéré être identique à celui isolé chez *P. cinnabarinus* I-937.

5

2) Construction du vecteur d'expression utilisant le promoteur du gène de la laccase

A partir de la séquence du gène de la laccase, les Inventeurs ont cloné le promoteur de ce gène en utilisant la même stratégie employée précédemment pour l'isolement du gène, c'est-à-dire avec une technique de PCR inverse sur un fragment d'ADN génomique (3,5 kpb) coupé cette fois-ci par l'enzyme de restriction *Bg*II (Fig. 5). Deux mille cinq cent vingt sept kpb en avant du gène de la laccase ont été ainsi cloné par PCR inverse et séquencé. Ce promoteur a été placé dans un vecteur une résistance à l'ampicilline pour son sous-clonage dans la bactérie et une résistance à la phléomycine utilisé comme marqueur de sélection dans le champignon. Un terminateur du gène codant pour l'hydrophobine sc3 de *Schizophyllum commune* a été placé en aval afin de terminer l'étape de transcription. Ce vecteur appelé pELP sera utilisé pour l'expression homologue de la laccase (Fig. 6). Deux autres promoteurs hétérologues ont été utilisés dans cette étude. Ce sont les promoteurs des gènes codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (gpd) et l'hydrophobine (sc3) de *Schizophyllum commune* (Fig. 6), constituant respectivement les vecteurs d'expression pEGT et pESC. L'intégralité des séquences nucléotidiques de vecteurs pEGT (SEQ ID NO : 12), pESC (SEQ ID NO : 13), et pELP (SEQ ID NO : 14), se trouvent dans les figures 7, 8 et 9 avec les positions du promoteur, du marqueur de sélection et du terminateur.

25

*III) Transformation de la souche monocaryotique avec les vecteurs d'expression (modèle d'étude : la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*)*

1) Préparation du mycélium pour l'obtention de protoplastes

30

Un quart d'une colonie cultivée en milieu solide (10 jours) est homogénéisé avec un mixeur (type Ultraturax, vitesse lente) pendant une minute dans 50 ml de milieu YM (par litre : glucose 10 g, peptone 5 g, extrait de levure 3 g, extrait de malt 3 g). Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 250 ml stérile où l'on rajoute 50 ml de milieu YM, puis incubé à 30°C et sous agitation (225 rpm) pendant 20 heures. La culture est une nouvelle fois homogénéisée pendant 1 min (vitesse lente) et on rajoute 100 ml de

milieu YM. Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 500 ml et mis en culture pendant une nuit à 30°C.

2) Préparation des protoplastes

La culture de champignon est centrifugée pendant 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant (tube de 50 ml). Seize g (poids humide) sont lavés dans 40 ml d'une solution de MgSO₄ 0,5 M ou de saccharose 0,5 M. Dans le cas de l'utilisation du saccharose, l'enzyme lytique utilisée pour digérer les parois est diluée dans le saccharose. Le mycélium est ensuite centrifugé 10 min à 2000 rpm et le surnageant éliminé. Concernant la lyse des parois fongiques, on ajoute au mycélium provenant de 50 ml de culture, 10 ml d'enzyme lytique (Glucanex, Sigma) dilué à 1 mg/ml dans une solution de MgSO₄ 0,5 M . La digestion se fait dans un erlenmeyer de 500 ml à 30°C sous faible agitation pendant 3 à 4 heures. Pendant cette incubation, l'apparition des protoplastes est contrôlée au microscope. Dix ml d'eau stérile sont rajoutés, puis mélangés délicatement. Les protoplastes sont laissés 10 min, le temps que l'équilibre avec l'eau se fasse (les protoplastes vont flotter à la surface). Ils sont ensuite centrifugés 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant. Le surnageant contenant les protoplastes est transféré délicatement dans un nouveau de 50 ml. Le culot restant peut-être re-incubé avec 25 ml d'une solution de MgSO₄ 0,5M pour récupérer le maximum de protoplastes (on répète alors l'étape de centrifugation). Un volume de sorbitol 1 M, égal à celui de la préparation des protoplastes, lui est rajouté. Pendant 10 min, on laisse les protoplastes relarguer l'eau. Cette préparation est ensuite centrifugée 10 min à 2000 rpm. Le surnageant est éliminé, tout en laissant un peu de sorbitol. Les protoplastes sont transférés dans un nouveau tube. Le précédent tube est rincé avec la solution de sorbitol 1M et les protoplastes récupérés, ajoutés dans le nouveau tube. Les protoplastes sont comptés et centrifugés 10 min à 2000 rpm. Ils sont ensuite dilués à une concentration de 2. 10⁷ protoplastes par ml dans la solution de sorbitol 1M. Une solution de CaCl₂ à 0,5 M (1/10) est rajoutée aux protoplastes.

b) Transformation des protoplastes

Pour la transformation, 100 µl de protoplastes sont transformés avec 5 à 10 µg de vecteur, lorsque nécessaire de 10 µg d'adénosine amidotransférase pour empêcher les protoplastes de se déshydrater dans le flacon. Les protoplastes sont alors placés sur une plaque de culture. L'adénosine amidotransférase est utilisée pour empêcher la déshydratation des protoplastes.

Deux et demi ml de milieu de régénération (pour 100 ml : glucose 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 12,5 g, KH_2PO_4 0,046 g, K_2HPO_4 0,1 g, bacto peptone 0,2 g, extrait de levure 0,2 g) sont rajoutés aux protoplastes qui sont incubés une nuit à 30°C. Des boites de sélection (milieu YM contenant de la phléomycine à 7 µg/ml, boites carrées) sont préchauffées à 37°C. Sept et demi ml d'un mélange de top agar (Low Melting Point agarose 1% dilué dans un milieu YM contenant de la phléomycine 7 à 10 µg/ml) sont ajoutés au milieu de régénération contenant les protoplastes et sont versés sur les boites de sélection préchauffées. Quand la solution de top agar s'est solidifiée, les boites sont incubées à 30°C pendant 4 jours. Les transformants sont alors transférés sur de nouvelles boites de sélection.

4) Ciblage des transformants

A partir de 16 g de mycélium, on obtient généralement de l'ordre de 1 à 2.10^7 protoplastes. Le pourcentage de régénération est de 10 %. Concernant le vecteur pESC, les monokaryons ont été transformés avec le vecteur contenant le cDNA (BRFM 472, 473 et 474) ou le gène codant pour la laccase de *P. cinnabarinus* (BRFM 470 et 471) (Fig. 10). En parallèle, d'autres monokaryons ont été transformés avec les promoteurs pEGT (GPD11, 12 et 13) ou avec le vecteur pELP (12.3, 12.7 et 12.8) contenant le gène codant pour la laccase (Fig. 10). Au vu des résultats deux transformants se dégagent du lot avec des activités équivalentes, les transformants 12.7 et GPD14. L'activité au cours du temps a été suivie pour les transformants GPD14 et 12.7 (Fig. 11). L'activité est détectable à partir de 3-4 jours et augmentent jusqu'à 12 jours pour atteindre approximativement 1200 nkatal/ml soit 72000 U/l avec ajout d'éthanol dans le milieu de culture.

25

Légende des figures

Figure 1 : Isolement de souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase.

30

Figure 2 : Isolement du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* laccase.

Figure 3 : Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 4 : Séquence du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

5 Figure 5 : Séquence de la séquence promotrice pLac du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à l'ATG codant pour la méthionine de la laccase).

10 Figure 6 : Carte physique des trois vecteurs d'expression pEGT, pESC, pELP, utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 7 : Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène gpd (4480-5112), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène sc3 (71-507).

15 Figure 8 : Séquence nucléotidique du vecteur pESC, contenant le promoteur du gène sc3 (1-1033), un marqueur de résistance à la phléomycine (1540-2855) et le terminateur du gène sc3 (1104-1540).

20 Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP, contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène sc3 (71-507)

25 Figure 10 : Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témojn) éthanol.

Figure 11 : Suivi des activités laccase des transformants GPD 14 et 12.7 en fonction du temps avec ou (témojn) sans éthanol.

REVENDICATIONS

5 1. Procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamentueux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et comprend :

- 10 - une étape de mise en culture de la souche monocaryotique de *Pycnoporus* susmentionnée, ladite souche étant transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,
- 15 - le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différencierées appelées basides, 25 au sein desquels a alors lieu la caryogamie, suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendre un mycélium monocaryotique.

20 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Le document contient une ou plusieurs signatures. Les signatures sont soit en bleu, soit en noir. Certaines signatures sont très légères et difficilement lisibles. Les signatures sont placées au bas de la page, généralement alignées sur la droite.

correspondant à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales.

5 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
- ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou 10 l' α -amylase.

15 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée..

20 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée, notamment par un marqueur histidine.

25 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

30 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,

- une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique

correspondant à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales.

5 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
- ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou
10 l' α -amylase.

15 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée.

20 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée, notamment par un marqueur histidine.

25 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

30 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase.

 - une étape d'isolation du promoteur correspondant à l'expression du gène de la laccase endogène de la souche *Pycnoporus* utilisée, et de sa séquence de promotionne, et de son intégration dans le vecteur d'expression.

comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,
- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

8. Procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus* selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

* le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

* ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféïque et les lignosulfonates.

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEO ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

* le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizosaccharomyces pombe*, dont la séquence nucléotidique est représentée par DDBJ ID M314.

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

5 9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2 le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

15 - la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

20 10. Séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

25 11. Vecteur d'expression, tel que le plasmide pELP, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* selon la revendication 10.

12. Vecteur d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* selon la revendication 11.

30 13. Vecteur d'expression selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant à une protéine endogène de *Pycnoporus* choisie parmi les suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

5

11. Procédé selon la revendication 10, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

10

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2 le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène gpd ou sc3;

15

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

20

12. Vecteur d'expression, tel que le plasmide pELP, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

25

13. Vecteur d'expression selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac*.

30

14. Vecteur d'expression selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant à une protéine endogène de *Pycnoporus* choisie parmi les suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase.

- celle utilisée déterminant la présence de l'hydroxyl groupement hydroxyle.

15. Cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression selon l'une des revendications 12 à 14.

5 16. Cellule hôte selon la revendication 15, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

10 17. Utilisation de vecteurs d'expression selon l'une des revendications 12 à 14, ou de cellules hôtes selon la revendication 15 ou 16, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée selon l'une des revendications 1 à 9.

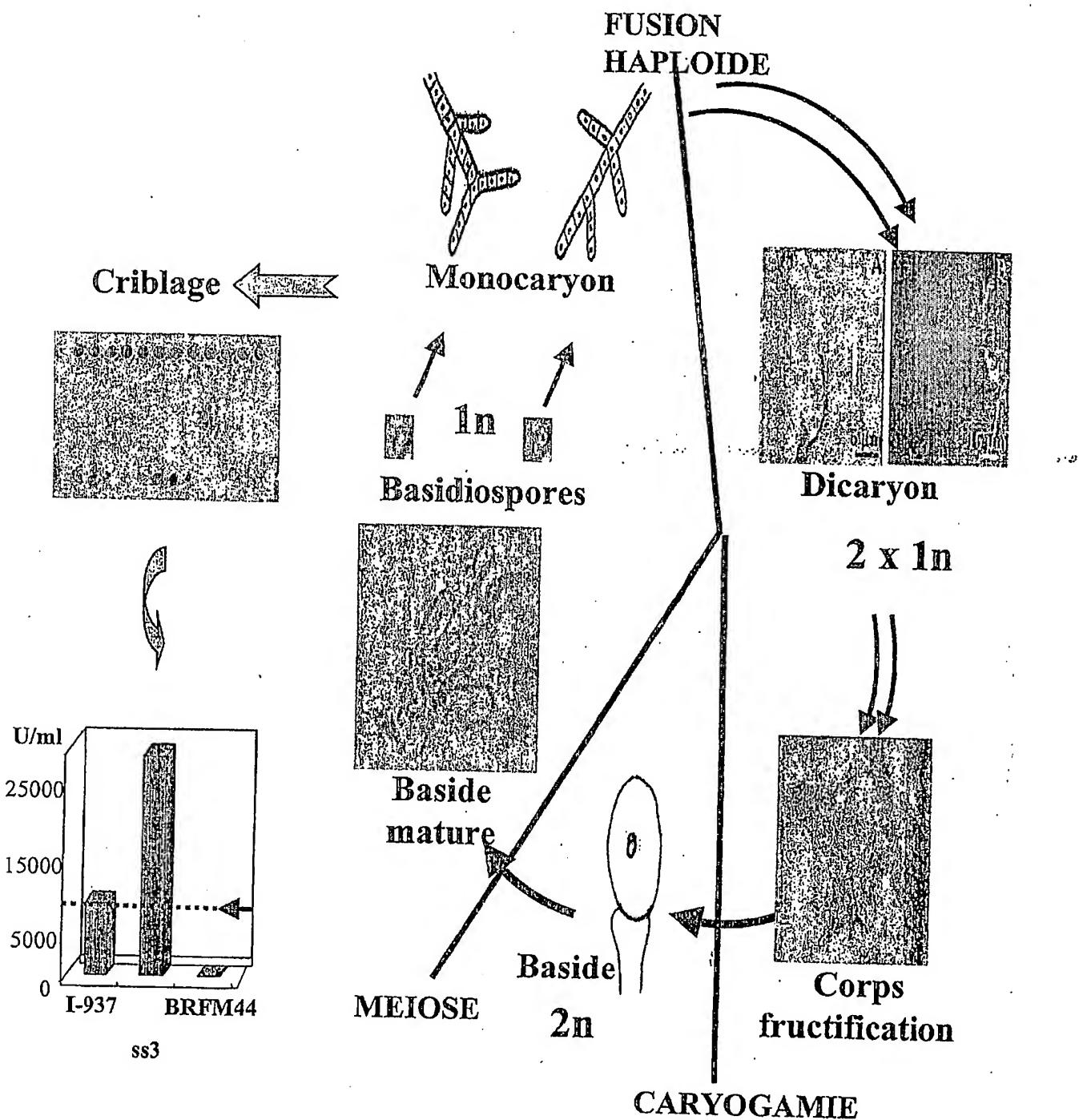
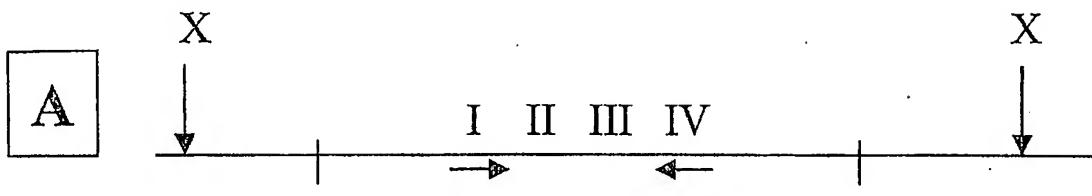


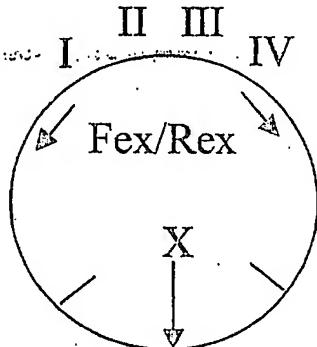
Figure 1 : Isolement de souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase



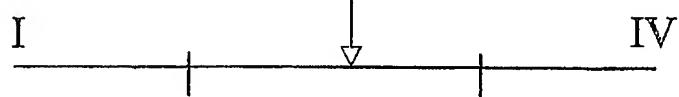
F2/R8

Fex/Rex

B



X



Fex/Rex

C

Gène laccase
(2500 pb)

Diagramme de la séquence de gène codant pour la laccase de *L. corymbifera* (gène laccase).

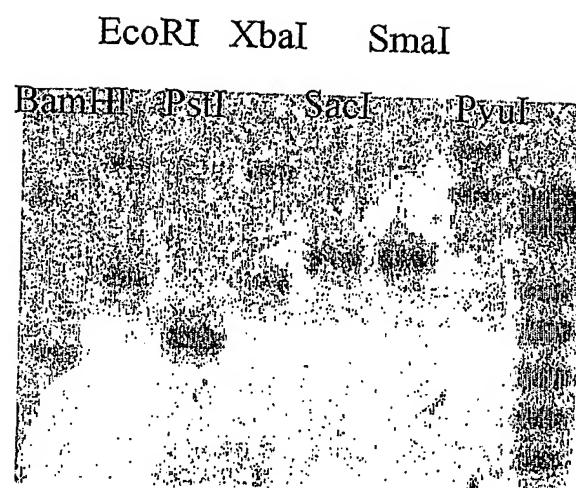


Figure 3 : Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pynoporus cinnabarinus*

AGATCTCGAACAGAAAATGCGATTGCGTTAGGCCAATTAGAATAAAAGCTGCGTCAGGGCAGCAGCTA
 TCTTGATCCATCATTGACTCACCGGCATCGCGTCAACACCAAAGCAAGCTCGTCCCACCCATAGGCGTGCA
 CCGGCCGGCGTGCGCCATTGAGGTACATGAGCGGGCGAAAGTCCGCCATTGTAGCCCTGCGTGGACGCG
 CGGCGATGAAACGTTCCCACCATGGGAAGAAACGCTCTGCGGCCATCATCCTTCACCGGATGACAAGGC
 GGCCTCGCGCCTTGCAGAGGCCGGCGACATGCACAGCAAGGTCCGTTGCGGATGGGAAGCAGG
 CAATCAGTGGGTGTCCTACGCCACGATGGTGGGAGCGTAGGCCCTCCATAAGGCCAGCAGCATC
 ATGATGCTCTCGGATTGGAGCCTGGTGCATGCTGGAGAGACTCTCTCCAGAGACCAGTGTGCGCAAC
 GTTCTGGCCTGGAAGACTTTAAAGTGAGTGTAGAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGGATTGCGAGAAC
 ATCGGCATCCTCAGCCTGGGAAGGATGGCTTGGTAGACATTGCCAGGATGGTCTAGATGTGAGCGGGC
 TTCTGGATGATCATGCTGAACCTCGTGGTACGCATGCCAGGATTGAGCATTACGGT
 ATGCCCTCCATTCAAAACGATAACCCCTCCCTCAGGTTGGTCATCTCATAGAGCGCACGCTCTCAAGG
 CCTAGGCCTATTCAACACCTCCTCGAACATCCCTATTACCGGTCTGTAAGGAACGACTTGTCTGGATC
 ACATGAAGTGCAGCATACTGTTGCCGGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAAGTCGACATCCAAGCGT
 TCAGTCACCACATGCCAAAAAGCTGACCCATACTTTATGGTAGGTTGCTGAGTGGTATAACAGTCAT
 TCATGAGGAATGCCACCGGATAGGGTGTGGCGGCCAATATTATCGCCTGGCAATAGTCGATGTGCGT
 CCTTGTCAATGAATATCATGGTCACATGGAGACGGTAAACAGCGTTGACTGTGAATCCCTGGTGT
 GTGGCCGAGACAGTACGTTGAGGAACACCAATATCTTCCGGCAGGCCAGTCTTGGAGGCCACAG
 GCAGGCATCGCGAACAGATCCAGCCATCCGGCTCTGACATTGGGATACCTGAAGCCCTCAGGTACGG
 AGCGAACAGAGGTGGGCTCTGAGCGATTGGCGGACGGATAGCTGTATTTCCCTCTCACCATGGGAAGAT
 GTGAAAGGCTCCATCATATAGCGGCTCAACTCTACCTCGAATGTCAAACACGGCGGGAAATACTTATTATG
 TGGACAAGGCCGAGCTATGATAGCTTGTCCCCAGTTGGTAAGTCCCGAATCTGCCGTTAGGCCAACAGT
 CTCGGAAAAATAAGAAGAATATTGTAGGTGCGTGTAGGCGTATGCCCAATGCGCACACACGGAGGCTTTA
 GGAGATGAAGCGCCCGTGAGCGGTAAGGGAGTTGGTCACCGCCGGGACCGACTCTCTCTTCCAG
 CATCATGCTCGGCCAAACTTACCCCTATTGACCAACTCCACGAGAAAGCAGGAACAGCTTCTGT
 CTCATGACGTCGCCAATCCAGACCCCTAGCCGGTCTGTTACTCATCGTTATCCCTGCCCATGGTAGTGG
 GTCAGCCTGGCAGCGTAGTCCGCTCTCTGCTGCACTAGAGAAGCCCATGAGACAGCGTTTTGC
 TTTATTCTGCTGTTCTATAGACACCATAAGGGCAACGATCCTGCACGCCAGAGGTATTGGGCTCGTCA
 GATTCAGTTCTCCTCGGCTGAAATGGCTGCACGGCAGATAAAATGGCGGGAAATGCTATAGCC
 CATAGCCCGCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTGTCAGTCAGGTCGGTGAGTGGCTCTCACGAAGAGCGTCAA
 CTTCGCGCGACAGCCCTTCAGGGCAAGATAGATCCTCCCATCATCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTAC
 CGAACAAATTGACTTACCGACATCCTCCGGGACGCGCAAATGCTGTTGCGACGGAACGTAATCCTCTCGTCCC
 GCCTCTTTCGCTCTCACGCAATTGGTGTGGTGTGGCGACGGCCGCTCATCAGGACCAAGCAGTCTCAAT
 GTCTGGTACCGGACAATGGTACACTGCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTACTCTGGTGCACCGTCGCTTAC
 GCTGACCTTCGGGATACTGTCCTGCAGACATCTGGAGGCCCTGTCCTTCCCTAGTATAATGATGTC
 CGCAGGTCTTGAAGACCCTCGAGTCCCACTTGAGTTAGTAGGACCTGTCACCAAAACCCCTTTCT
 GATCATG

Figure 5 : Séquence de la séquence promotrice du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à l'ATG codant pour la méthionine de la laccase)

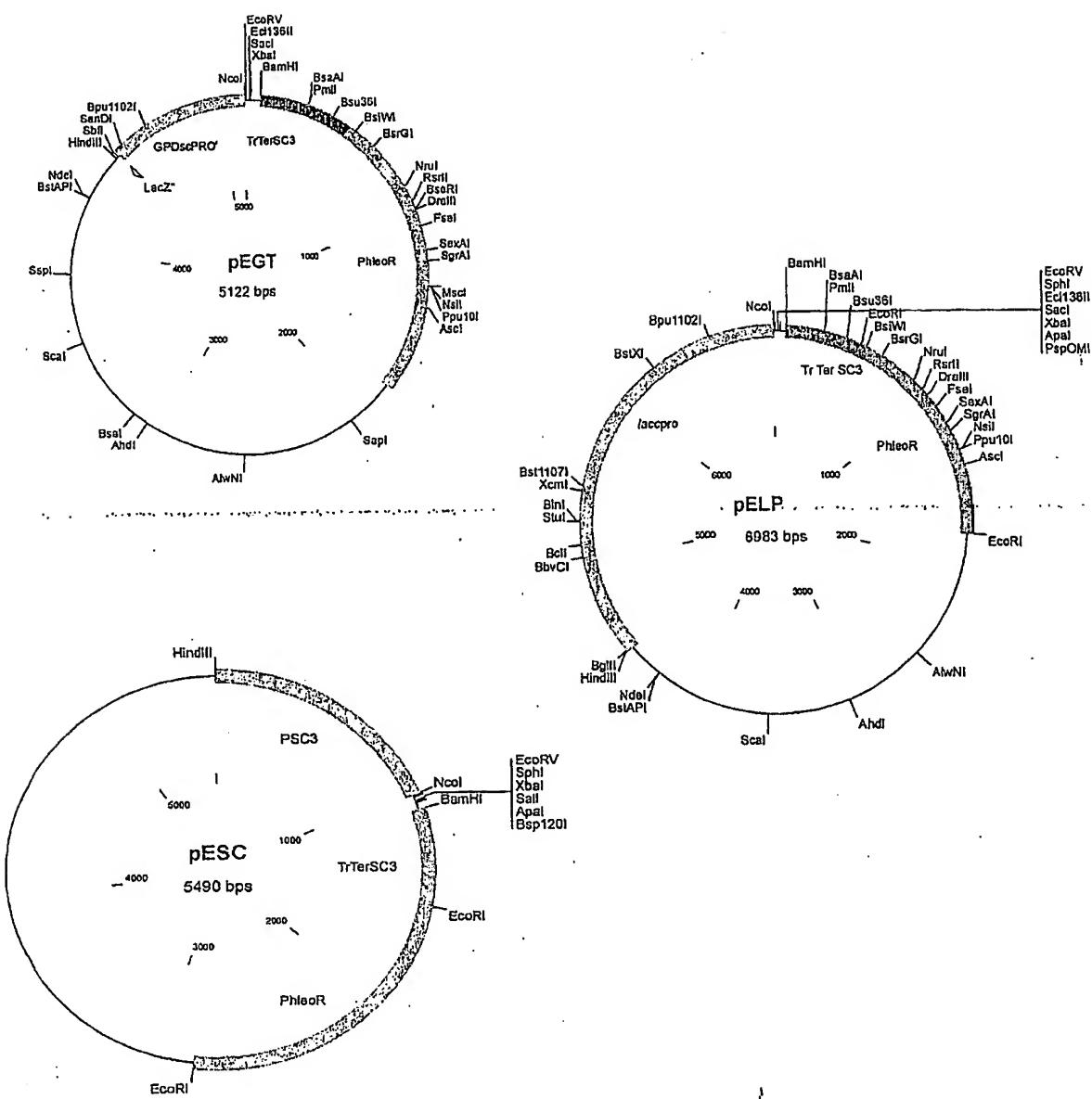


Figure 6 : Carte physique des trois vecteurs d'expression utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus*

CATGGGATATCGCATGCCCTGCAGAGCTTAGAGTCGACGGGCCGGTACCGCGGCCCTAACGCGGTGGATCCCAGGTGAAC
 CGCCTATCGTGGGATATTGGCCACGGGAGCCTCGCAACTGAGCTCGTTACTGCCTAGCAAATCGGAATCCCTTGATGT
 CATAGGCTCGGACAAGTGAATCGTCTGCTACATACTCCAAGGCTTGACTCATCCCTCGATAATGAACATTGTTGTTGTTG
 TTCTCTATCCGCTCAGTCAGCGACCCCCAACCGTGCATGGTGAATTCGCCACGCAACACCAGCATGACGACATGGCGAACCTAA
 TAAAGGCTGAGTCGTGGACTAAAGCACTCCACTTACGGCGAGGATGCCAGTACGTCATGAATGAACGCCAGGTCCCAGGAAAGTAA
 GGGGTACAAAAGGAGGGTGAAGGTTGGACGTTCTTACCATCCACCTCCAGACCAACATGCCGGAATTCCCAGCTTGCT
 CAAAAGGTTCTGCCGTACGCCGCAAATTCTCGAGGTGCCCTATCGCATACTCACGACTTCAAACATCCATCTATC
 ATTGTTGGGATCGTACAATTAATTAGACATGTTGACAACTGTTACATTCTTCTCTTACTCTCCGGCCAGTCTATGTTAGAGGAA
 GTACAAGCGCTTCAAAGGAGTACGGCACTTAGAGGCCCGCTTCTGCTGCCGTTAGAGCGCGCCGCTTCGCTCGCCGCTAGACG
 AGCAGGTCGAGACAGCGGGAGTAGCCCCACTCTGTCGTAACCGAATGAGCTTACCGAAGCTTCTGCTGATCGCGATGCCG
 GGGATCGTACCGCGCTTAAAGGGCGCCGGTACCCCCCTCGGACCCGCTGGCCGCTGGAGCCGGGCTTGGTCCGGCGTCCG
 TCAGTCCTGCTCTCGGCCACGAAGTGCACGCACTGCCGGGGTGCAGCAGGGCAACTCCGCCAACCGCTGCTGCCGAT
 CTCGGTCACTGCCGGCCGGAGCGTCCCGGAAGTCTGTTGACAGCACCTCGGACTCTGGTGTACAGCTGTCAGGCCGCAAC
 CCACACCAGGCCAGGGTGTGCTCCGGCACCCACTGGTCTGGACCCGCGCTGATGAACAGGGTCACTGTCCTCCGGACCACCGGC
 GAAGTCGCTCTCCACGAAGTCCCCGGAGAACCCGAGCCGGCTGCTCAGAACCTGACCGCTCCGGCAGCTCGCGCCGGTGA
 CGGAAAGCCGACTGTCACCTGGCCATGCACTGGTATGGGATTATGTGTGATGGGATGCCATGGAGAGGGAAAGTGTCTGGATG
 GGAGTGTGGAGAAAGAGGGAGACGGGGGGCGCCGCGCTTATACCCACGCCAAAGATCGATGACTGACAAACGGGA
 TGAAACACATCGCGCGCCGCTGGACTCGCCCATCTGCAATGGGCAATTGGGATTATGTGTGATGGGATGCCATGGCTGGTGA
 CCCCTCGAGGGCGACGCTTATCTATCCATGCCGCAATTGCAAGGTGCGCGGCTGCAAGAACAGTCTTCGCACTGCCACC
 TGGGCTGCAACCTGTCTACCTCTCATCTAACCCCTCCGCGCTCGCAGTACAGTTACTAATCTCACACCGAAGAGGGCTCGCG
 CACCCCTCGATCCGAGCACGTCCTACATGCCACAGCGTCAGATTGAAACACAATGCACGTCACTGAGATCCCCGGAAATCGT
 AATCATGTCATAGCTTCTCTGTTGAAATTGTTATCGCTCAACATTCCACACAATCGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAAG
 CCTGGGGTGCCTAAATGAGTGAAGTCAACTCACATTAAATGCGTTGCCCTACTCCCGCTTCTCCAGTGGGAAACCTGTCGTCAGCT
 GCATTAATGAATCGGCCAACGGCGGGAGAGGGCGGTTGCGTATGGGCGCTTCTCGCTACTGACTCGCTGCGCTCG
 GTCTGCGCTGCGCGACCGGTATCGCTCACTCAAAGGCCGTAATACGGTTATCCACAGAAATCGAGGGATAACCGAGGAAAGAA
 CATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTGTGGCTGCGTTTCCATAGGCTCGCCCGCCGCG
 AGCATCACAAAAATGACGCTCAAGTCAGAGGTTGGCGAACCCGACAGGACTATAAGATAACAGGGCTTCCCTGGAAAGCTCC
 CTCTGCGCTCTCGTCCGACCCCTGGCTTACCGGATACCTGCTCCGCTTCTCCCTCGGGAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTC
 ACCTGCTAGGTATCTCAGTCTGGTGTAGGTCGCTCCAGCTTACGACTTACGCCACTGGCAGCAGCCACTGTAACAGGATTAGCAGA
 TTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTGTGGCTTAACACTACGGTACACTAGAAGGAGCATTTGGTATCTGGCT
 CGCAGGTTATGTAGGCGGTCTACAGACTTCTGAAAGTGTGGCTTAACACTACGGTACACTAGAAGGAGCATTTGGTATCTGGCT
 CTGCTGAAGCCAGTAACTTCCGAAAAGAGTTGGTAGCTTGTATCCGCAACAAACCCAGCTGGTAGCGGTGTTTTGTT
 GCAAGCAGCAGATTACCGCGAGAAAAAAAGGATCTAAGAAGATCTTGTATTTTCTACGGGCTCTGACGCTCAGTGGAAAGC
 AACTCAGTTAAAGGATTGGTGTAGGATTATCAAAGGATCTTACCTAGATCTTAAATTAAAATGAAGTTTAAATCAA
 TCTAAAGTATAATGAGTAAACTTGGTGTAGCAGTTACCAATGCTTAATCAGTGGGACCTATCTAGCGATCTGTCTATTICGTT
 ATCCATAGTCCCTGACTCCCGCTGCTGATGATAACTACGATACCGGAGGGCTTACCATCTGGCCCGTACGTCATGAGAATG
 AGACCCACGCTEACCGCTCCAGATTATCAGCAATAACCGCAGCCGGAGGGCCAGCGCAAGAGTGGCTCTGCAACTTAT
 CGCCCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTCGGGAGCTAGAGTAAGTGTGCTCCAGTTAAAGTTCGCAACGTTGTTGCGATTGCT
 ACAGGCATCTGGTGTACGCTCGTCTGGTATGGCTTCTAGCTCCGGTCCACGATCAAGGGAGTTACATGATCCCCCA
 TGGTGTGCAAAAGGGCTTAGCCTCTCCCGTCTGCAAGAGTAAGTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGG
 AGCACTGCTATACTCTTACTGTCATGCCATCGTAAAGTGTCTTCTGTCAGTGGTAGACTACCAACAAAGTCATCTGAGAATAG
 TGATGCGGCCAGGGACTTGTCTTCTGGGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCGAGACTTAAAGTGTCTCATATT
 GGAAAACGTTCTCGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGGCTGTTGAGATCTCAGTGTAAACCCACTGTCACCCAACTG
 TCTTCAGCATCTTAACTTCACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAATGCCCAAAAAGGAATAAGGGCGAC
 AGCGAAATGTGAATACTCATCTCTTCAATTATTGAAAGCATTTACGGGTTATGTCTATGAGCGGATACATATTG
 AATGTATTAGAAAAAAACAAATAGGGGTTCCGGCACATTCCCGAAAAGTCCACCTGACGTCTAAGAAACCAATTATCA
 TGACATTAACCTATAAAATAGGCGTACAGCAGGGCTTCTGTCAGTGGGAGCTACGGGATGCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGG
 AGCTCCGGAGACGGTCACAGCTGCTGTAAGCGGAGTGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGAGCTGGGGTGTGGGGGG
 TGTCGGGGTGGCTTAACATAGCGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTAACATTCCGACAGATGCGT
 AGAGAGAAAATACCGCATCAGCGCATTGCCATTAGCGTGCAGACTGTGGGAAGGGGATCGGTGCGGGCTTCTGCTT
 CGCCAGTGCAGGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCAGATTAGTGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCAGCAGCTGAAAACGAC
 GGGCCAGTGCAGGCTTGTGCTGCCAGTGGCGACGGCAGGCCAGCGCAGCCAGCTATCCCGCGCGGGTGGGACCCAAAATAA
 GCGGGCCCGCCGCCGCCCCCTGGCGAGCGGGTGTATACGAAGGAACTGGGAGGGCAGCTGGAGAAGACTTGGTTAGAAAGGG
 GAACACCATCCCGACGGGCCAGTGCTGCTGGDCAGCTGAGCGTCAATTGTTGCAATTCTGACCTGTCAGTGAAGGAACGTC
 GGGATCGGAGGGTGGCGAGAGCCTCTCGTGTGAGATTAGTAACGTACTGCGAAGGCCGGAGGGGTTAGGATGAGAGGTAG
 ACAGGGTCGAGCCAGGGACTGCGAGAAGGACTGCGAAGGACTGTTCTGACCCGCACTGCAATTGCGCATGATAGAATAGA
 GCGTCGCGCTCGAGGGGGACTCGACCAAGGGCTGTTGCGTGGCGCCGACGGGACTGGCTGGGATTGCAAGTGGCGCCAGTC
 GCCGCCGCCAGTGTGTCATCCCGTTTGTCACTGATCGGATCTTCCGGCTGGTATAAAAGGCCGCCGCCGCGTCTCC
 CTTCTCCAGCACTCCCATCCAGAGCACTCCCTCTCCCATCGCATTCCACACAAATACTCC

Figure 7 : Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène gpd (4480-5122), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène sc3 (71-507).

AGCTCTCCGGCCCCGAATCGAACGGCAGGATGTGGGCGTGTCCAATATTGCCATGAAAATCTGTCAGAAGTGAGCCCTCTCGTCAC
 CCTGTACAGCTTCGCTGAGTTGAAAAGCAGGGTTCATCTTGGGCTACTGATGCACTGAGCTGACCAGGAAACTAAATGACCAGCCG
 AGTGTCACTAACTTAACGCCGGTATTCAAGGGCAGCTCTCATGTCGCTGAGCTAGATCACCGCCATGAACGGGGAAACG
 GGGAGGGGGCGTTGGTACGTCTTACGTCGCTGAGCTATGTTGATTTGACAGCCGCTCTGCAGAAGAGATGGGACAGGACGATGCGGAGCG
 GCCAGTGTGCGGATGTCACGTTGGCCATCCTTGGTAGACAGACGGAAAGAGCTTGGAGGTGCGATTCCCTACGAATGGGA
 AGGGGCTTAGATGGAGAGTGACACGCTGAGCTCCCACACGCCCTCGCCGGAGGGTGCCTCTCCGGAGACATTCACCTCAGTTCATTG
 TTCTGACCTGCTTAATTTGATAGACCGGCAACAACTCTGACGCCATCATACAGTGCCTGACAGAGCCCTCCACTCAGTGC
 CGCCCTCCCTCAATCAA TCCC ACTA CTGCCGGCTCTGCCGCTCGACACGTCGCTTGAAGAGCCGGGACGGCGTCCGC
 TCCCCCTTCCCTCCCGCTCATGCACGCA CGTTA ATGTTGCTGCAGGCA GCGTAAGTATA TCAAAGGCGTAGCGAATGAATAG
 CAGGCGCGGGGACCTGCCACGCGCATGAACATGAGCAGACTGGGTGACGATAACTGAACTCAGACGCGGAATGAATATCCA
 AACCGCGGGAGAGAAAATTAATTACGGGAGCCCTCCAGGTTAAAGACGCCCTACCCCTCCGGCTACTTCCAGTCAACACCCAGT
 TCAACTACCCAGGCCCTCCCTCTGCTATCCTCYTTACAACCTGTCGCTCATGGGATATCGCATGCTCAGAGCTCTAGAGTCGAC
 GGGCCGGTACCGCGGCCCTTAAGACCGTGGATCGCAGGTAACCGCCATCGGTGGGATATTCCGGGACAGGGAGCCTCGGC
 AATCTGAGCCTCGTTACTGCTAGCAAATTGGAATCCCTCGATGTCATAGGGTGCAGGACAAGTGTATCGTCTGCTACATACTCCAAG
 GTGTTGACTCATTCCCTGATAATGAACATTGTTGTTGTTCTATCCGCTCAGTCACCGCACCCACACGTGATGGTGAAC
 TTGCCCACGCAACAACCGCATGACGACATGCCAACCTAAGTAAGGCTGAGCTGGACTAAAGCACTCCACTTACGGCAGGAGATGG
 CAGTCTACGTCATGAATGAAGCCTCAGGTCGGAGTAAGGGGGTACAAGGGGGTGAAGGTTGGACGTTTCTTACCATCCTCCA
 CCTCCCAGCACCATTGCGGGAATTCCAGCTTGTCTTAAAGGTTCTGCGGCTACGCCCCGAAATTCTTCTGAGGTGGGCCCCTATCG
 CATACTGACGACTTCAAACATCATTCATATTGTTGGGATCGTACAATTAGAGATCTGTTGATGGGATCGTACATTTCTTCTT
 TTACTCTCCGGCCAGTCTATOTAGAGGTAAGTACAAGGCTCAAAGGATCAGGCACTAGAGCCCGCGTCTTGTGCTTCCCGCTTAC
 AGCGCGCGTCTGCTTCGGCGTAGACGAGCAGGTCGACAGACCGGGAGTAGCCCCACTCGTTGTGCTTACCGAGCAATGACCTT
 CACGAAGCTCTGCTGATCGCGATGCCGGGATCGATCCACGCGCTTAAAGGCCCGCGGTACCCCTCGGACCCGTCGOGCGCGTC
 GGAACCGGCGGTGGTGGCGCAGTCGCTTCCGGGACAGGAAGTGCACGAGTTGCGGGGCCGGTGAACAGGGTCACG
 CCGCCCCCACGGGCTCCTCGGATCTCGGTCATGGCCGGGGAGGGCTCCCGGAAGGTTGCGGACACGACCTCCGACACTGGCGT
 ACAGCTGTCAGGCCGCAACCCACACCCAGGGTGTGCGGACCCCTGGCTCGGCTGATGAACAGGGTCACG
 TCGTCCCGGACACACCGGGGAAGTCTGCTCCACGAAGTCCCGGAGAACCGAGCCGGTCCAGAAGACTCGACCCCTCCGGGAC
 GTCGCGCGGGTGAGCACCGGAACGGCACTGGTCAACTGGCATGCGTGTGGGATATTGTGTATGGGATCGATGGGAG
 GGAAGTGTCTGGATGGGAGTGTGGAGAAAGAGGGAGACGGCGGGCGGCCCTTATACCCACGCCGAAAGATCCGATCGATA
 CTGACAAAACGGGATGAAACACATGGCGGGCTGACTGCGGCCATCTGCAAATGCCAGCCAGTCCGTCGGGCCACCACCA
 GCCCTGGTCAAGTCCCTCGAGGGCGACGCTTATCTATCCATGCGCCTAATGCGAGTGGCGGTCGAAGAACAGTCTTCGCACT
 CCTTCTCGCACTTGGGCTGGGACCTCTGCTACCTCTCATCTAAACCCCTCCGCGCTTCCGACTACAGTTACTAATCTCACCCGAAGAG
 GCTCTCGCGCACCCCTCCGATCCGAGCACGTTCTTACATGCCACAGCGTCAAGATTGAACACAATGACCGTCA RATCAGATCCCCGG
 GAAATCGTAATCATGGTCAAGTGTGTTCTGTGTAATTGTTATCGCTCACAAATTCCACACACATACGAGCCGGAGCATAAAGT
 TAAAGCCTGGGTGCTTAATGAGTGAAGCTAACATTAAATGCGTTGCGCTACTGCCGCTTCCAGTCAGTGGGAAACCTGTCGTC
 GCTGCAATTATGAATCGGCCAACGCCGGGAGAGGGGGTTTGCCTATTGGGCGCTTCCGCTTCCGCTACTGACTCGCTGCGCTC
 GGTGTTGCGCTGGGCGAGGGTATCGCTACTCAAAGGGCGTAAACCGGTTACCGGTTACGGGTTACAGGGAATACCGCAGGAAAGAAC
 ATGTTGAGCAAAGGGCAGCAAAGGGCAGGAACCGTAAAAGGGCGCAGTGTGCTGGGTTTCCATAGGTCCGCCCCCTGACGAGC
 ATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAACACCGACAGGACTATAAGAATACCGGCTTCCCTGGAAAGCTCCCTG
 CGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCCTAACCGGATACCTGTCGCTTCTCCCTCGGAAAGCGTGGCGTTCTCATAGCTCACGCTG
 GGTATCTCAGTTGGTGTAGTCGTTGCTCAAGCTGGCTGTGTCACGAACCCCCCGTTGCGCCACCGCTGCGCTTATCGGTA
 ACTATGCTCTGAGTCCAAACCCGTAAGACGACTTATGCCACTGGCAGCGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG
 GGGGGTCAAGAGTCTGTAAGTGGGCTTAACCTGGCTACTAGAAGACAGTTGGGATATGCGCTCTGCTGAAGGCCAGTT
 ACCCTGGAAAAAGAGTGTGAGCTTGTGATCCGGGAAACAAAACCCCGTGTAGGGGTTTGTGTTGCAAGGAGATT
 CGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTGTATCTTCTACGGGTTGCTACGGGCTAGCTGCACTGGGAAACAAACTCACGTTAAGGGATT
 GGTGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCTTCTTAAATTAAAGGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAAC
 TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTTATTCGTTATCCCATAGTGTGCTACTCCGTC
 GTGAGATAACTACGATACGGAGGGCTTACCATCTGGCCCTGACTGCAATGATACCGGAGACCCACGCTCACCCTGCTCCAGATT
 ATCAGCAATAAACCGCCAGGGGAGGGCGAGCCGAGAACCTGCTTACGGGAAACCTGCTTACGGGAAACTTACCGCTTACCGTCT
 GGGAGAGTGGAGATGAGTGGAGTGGCTGAGTGGCTGAGTGGCTGAGTGGCTGAGTGGCTGAGTGGCTGAGTGGCTGAGTGG
 GTATGGCTTCTTACGGCTCCGGTCTCCAAAGATCAAGGGAGGTTACAGTATGCTGCTTACGGGAAACTTACCGCTTACGGGAA
 CTCCGATCGTTGCTAGAGTAAGTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCAATACTCTTACTGTCATGCCATCCG
 AAAGATGTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCAACCGAGTTGCTTGTGCT
 ACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGTCTCATTTGGAAAACGTTCTGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTAC
 CGCTGTTGAGATCCAGTGTGATGAAACCAACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTACTTACCCAGCGTTCTGGGTGAGCAA
 AAAACAGGAAGGCAAAGGGGAAATAGGGCGACACGGGAATTTGGAATACTCATCTCTCTTCAATATTATTGA
 AGCATTIATCAGGGTTATGTCATGAGCGGATACATATTGAAATGTTAGAAAATACAGGTTACGGGTTAGCTCTTGGG
 CGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAAACCATTATATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGGTGTATCACGAGGCCCTTCTGCT
 GCGTTTGGTGTAGACGGTGTAGGGGCTGACACATGCGACTCCGGAGACGGTCAAGCTTGTGCTGTAAGCGGATGCCGGAGCAGAC
 AAGGGCGTCAAGGGCGCTGAGGGGTTGCGGGGCTGCGCTTAACATGCGGCACTAGAGCAGATTGTACTGAGAGTCAC
 CATATGCGGTGTGAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCCCATTCAGGCTGCGCAACTGTGGG
 AGGGCGTCAAGGGCGCTGCTGAGGGGATGTGCTOCAAGCGGATTAAGTGGGTAACGCCAGGGT

Figure 8 : Séquence de nucleotidique du vecteur pESG contenant

la séquence codante pour la protéine d'ESG et la séquence de polyA.

Le vecteur pESG est donc un vecteur de transfert qui peut être utilisé pour exprimer la protéine d'ESG dans des cellules.

CATGGGATATCGCATGCCCTGAGACTCTAGAGTCACGGGCCGTACCGCGGCCCTTAAGACCGTGGATCCGCAGGTGAACGCC
 CTATCGGTGGGATATTGGCGACGGAGCCTCGCAATCTGAGCCTCGTAACTGCCCTAGCAAATTGGAAATCCCTCGATGTCATAGGGT
 CGCGGACAAGTGATCGCTTGTACATACTCCAAGGTGACTCATCCCTCGATAATGAACATTGTTGTTGTTGTTCTATCCGC
 TCAGTCACCGCACCCACACGTGATGGTGAACCTGCCACCGCAACACCGCAAGCAGCAGCTGGCAACCTAAGTAAGGCTGAGTCG
 GGACTAAAGCACTCCACCTTACGGCGAGGATGCCAGTCACTGCAATGAATGAAAGCCTCAGGCCCCAGTGAAGTAAAGGGTACAAAAGGAGG
 GTGAAAGGTGGACGTTTCTTACCATCCTCCACCTCCAGACCACCATGCCGGAAATTCCCAGCTTGTCAAAAAGGTTCTGCCGTACG
 CCCGCAAAATCTTCTGAGGTGGCCCTATCGCATACTGCACGACTCAAACATCCATTCTATCAATTGGGATCGTACAATTATTAGA
 CATTTGTGAAACGTTACATTCTTCTTACTCTCCGCCAGTCTATGAGGTTAAAGTACAAGCGTCAAAGGATCAGGCCACTT
 AGAGCGCGCCGCTTGTGCTTCCGCGTAGAGGCCGCCGCTCTGCTGCGCAGTGCAGACCGAGTAGGCCAGTGGAGTAGGCC
 ACTCGTGTGCTACCGGAATGAGCTTCAAGCAGCTTGTGATCGCAGTGCAGCGGGATCGATCCACCGCTTAAAGGCCGCCG
 ACCCCCTCGGACCGTCGGGGCGCTCGGCGACCGCGGTGTTGGTCCGCTCGGCTAGTCTCTGCCGATCGGCGTCTGCCG
 CCGCCGGGTGCGCAGGGCGAACCTCCGCCCCACCGCTGCTGCCGATCGGCGTCTGCCGAGTGCACGCGTCTGCCG
 GACACGACTCCGACCACTCGCGTACAGCTGTCAGGCCGCCACCCACCCAGGCGAGGTGTTGCCGAGGCCACTTGGTCTGG
 ACCCGCTGATGAAACAGGTACCGTGTCCCGGACCAACCGCGAAGTCGTCCTCCACGAAGTCCCGGGAGAACCCGAGCCGGTCTGG
 CAGAACCTGAGCCCTCCGGCAGCTCGCGCGTGAACGGCACTGGTCAACTTGGCATGATGGTATGGGATTATGTC
 TGATGGGATGCGATGGGAGAGGGAAAGTGTCTGGTGGAGAAAGAGGGAGACGGCGGGCGCGCGCCTTATACCCACG
 CCCAAAGATCCGATCGATACTGACAAAACGGGATGAAACATCGGCCGGCTGGACTGCCGCATCTGCAAATGCCAGCCAGC
 CGCTGGCGCACCACCGCCCTGGCTGAGTCCCCCTCGAGGGCGACGCTTATCTATCCATGCGCGAATTGAGGTGCGG
 AGAACAGCTCTCGCAGTCTCTCGCACCTGGCTGAGCCCTGCTCACCTCTCATCTAACCCCTCGCGCTCTGCA
 ATCTCACCCGAAGGGCTCTCGCGCACCTCCGATCCGAGCAGTCTTACATGCCACAGCGTCAAGAATGAAACACA
 ARATCAGATCCCCGGGAAATTGTAATCATGGTCAAGCTGTTCTGTGTGAAATTGTTACCCCTACAAATTCCACACAA
 AACGAGCATAAAAGTGTAAAGCTGGGGTCTTAATGAGTGA
 AACCTGTGCGCAGCTGATTAATGAAATCGCCAACCGCGGGAGAGGGGGTTGCGTATTGGCGCTCTCCGCTCTCGCTACTG
 ACTCGCTGCGCTGGCTGTTGGCTGCGGAGCGGATACAGCTACCAAGGGCGTAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACG
 CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGGCCGCTGCTGGCTTCTCCATAGGCTCCGCC
 CCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCGCGTGGCGT
 CTCCCTCGCGCTCTCCGTGGCACCTGGCTAACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTCGGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCT
 CACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTCGCTTCAAGCTGGCTGTGTCACGAACCCCCCGITCAGCCGACCGCTGCC
 ATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGGTGCTCGCTTCAAGACAGCTTACCGGACTGGTACAGGATTAGCAGAGCGAG
 GTATGAGGGCTGCTACAGAGTTCTGAAAGTGTGGCTACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTGCTGAAG
 CCAGTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTTGTACCGGCAAACAAACACCGCTGGTAGGGGTGGTTTTGGTCAAGCAGCAGA
 TTACCGCGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCCTTGATCTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAAGGAAACTCACGTTAAGGGA
 TTTGGTCTGAGATTATCAAAGGATCTCACCTAGATCTTAAATTAAGTTAAATCATCTAAAGTATATGAGTA
 AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGGGACCCATCTCAGCGATCTGCTATTGCTCATCCATAGTGGCTGACTCCCG
 TCGTGTAGATAACTACGATACCGGCTTACCATCTGGCCCTAGTGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGCTCCAGATT
 TATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGAAGGGCGAGCGCAGAAGTGGCTCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTG
 GGGAGCTAGACTAGTAGTTCGCCAGTTAATACTTGGCAACGTGTTGCTACAGGCGTCTGGTGTGACCGCTCGTCTGG
 TATGGCTTCACTCGCTGGTCTCCAAACGATCAAGGGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGGGTTAGCTCTTGGTCT
 CCGATGTTGCTGAGAAGTGTGGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCGATAATTCTTACTGTCTGCTGCT
 GATGCTTCTGCTGACTGGTAGACTCAACCAAGTCATCTGAGAATAGGTATGGCGGACCGAGTTGCTCTGCTGCT
 GGATAATACCGGCCACATAGCAGAATTAAAGGCTCATCTGGAAAAGCTTCTGGGGGAAACTCTCAAGGAJCTTACCGCT
 GTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTCAGCATCTTACTTCAACAGCGTCTGGGTAGCAGGAA
 GGAAGGAAATGGCGAAAAAGGGATAAGGGCGACACGGAAATGGTAATACTCATCTTCTTCAATATTATGAGCATT
 TATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTGAAATGTATTAGAAAATAAACAAATAGGGGTTGGCGACATTTCGG
 TGCCACCTGACGTCTAACGAAACATTATTATCATGACATTAAACCTATAAAATAGGGGTATCAGGAGGGCTTCTGCTCGCG
 TGATGACGGTGAACACCTCTGACACATCGCACTCCGGAGACCGTCACAGCTTGTGTAAGCGGATGCCGGAGCAGACA
 GGGCGCGTCACTGGGGTGTGGGGCTGGCTTAATGAGCGCATCGGCGTCAACTGAGGAGTGCACCATATGCGGTG
 TGAAATACTCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGGCCATTCCGCAACTCAGGCTCGCAACTGGGGAGGGG
 GCGGGCCTCTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCAGTAAAGTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCAG
 ACGGTTGAAACACCGCCAGTGGCAAGCTTAGATCTCCGAAACAGAAATGCGATTCGGTCAAGGCCAAATTAGAATAAGCTGCG
 GGGCAGCGACGATCTGACTCCATCTGACCTACCGGCGTCAACACCAAGCAAGCTGTCGCCACCCATAGGGCTGACCG
 CGCGTGCCTGCGCATTGAGGTACATGAGCGGGCGAAAGTCCGCATTGGTAGCCCTGCTGGACGCCGCGCATGAAACGTT
 TTGGGAAGAAACGTCGCGGCCATCATCCCTCACCGGATGACAAGGCCGCTCGCGCCTTGGCCAGAGGCCGGCGACATGCA

Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP, contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène sc3 (71-507) (suite de la séquence, page suivante)

CAGCGAAGGTCCTGCGGATGGGAAGCAGGCAATCAGTGGGTCTACGCCAACGATGGTCGGGAGCGTAGGCACCTCCA
TAAGGCGGCAAGCATCATGATGCTCTCGATTGGAAAGCCTGGCGATGCTGGAGAGACTCTCTCCGAGAGACCAGTGCGCAAC
GTTCCTGGCTTGAAGACTTAAAGTGAAGTGTAGAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGATTGCAGGAACCATCGGCATCTCAGC
CTGGGAAGGATGGCTTGTAGACATTGCGGAAGGTCTAGATGAGCGGGCTTCTTGTGATCATGTCGTAACCTTTCTGA
CCTCGTCGGTGTACGCATGGCAGGATTGAGCATTACGGTATGCTCTCCATTCAAAACGATAACCCCTCCTTCAGGTTGGTCATCTC
CATAGAGCGGCACGCTCTCAAGGCCTAGGCTATTACACCTCTCGAACATCCCTATTCAAGGCTAGTACGGGAGTCGACATCCAAGCGTTAGTCACCA
GGGATCACATGAAGTGCAGCATACTGTTGCCGGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAGTCGACATCCAAGCGTTAGTCACCA
CATGGCAAAAAGCTGCAACCATACTTATGGTAGTTCTGAGTTGCTGAGTGGTATACAGTCATGAGGAAATGCCAACCGGATAGG
GTGTTGGCGGCCAATTATCGCCTGGCAATAGTCATGCTGCTCTTGTCAATGAATATCATGGTCACATGAGGAGACGGTTAA
ACAGCGTTACTGTGAATCCCTGGTGTGTTGGCGAACAGGTACGTGAGGAACACCAATATCTCTCGGCAGCCCAGTCTTGT
CGAGCGCACAGGCAGGCATCGCAGACAGATCCCAGCCATCCGGCTCTGACATTGGGATACCTGAAGCCCTCAGGTACGGAGC
GAAGAGGTGGGCTCTCTGAGCGATTGGCGACGGATAGCTGTATTCTCTCTCACCATTGGGAAGATGTGAAAGGCTCCATCATAT
ACGGCTCAACTCTACCTGAATGTCAAACACGGGAAATACTTATTATGTGGACAAGGCCAGCTATGAGGCTATCGCCCCAA
GTGGTAAGTCCCGAAATCTGCGGTTAGGCAACAGCTCGGAAAAAAAGAAGAATATTGAGGTGCGTGTAGGCGTATCGCCCCAA
TGGCACACACGGAGGCTTAAAGAGATGAAGCGCCGTGAGCGTAAGGGAGTTGGTTACCGCCGCCGACCGACTCTCTCTT
CCCAGCATCATGTCGGCGAAACCTTACCCCTATTGACCAACTCCACGAGAAAGCAGGAAACAGCTTCTTGTCTCATGACGTC
GCAATCCAGACCCCTAGCCGTTCTGTTACTCATCGTTATCCCTGCCCATCGTAGTGTGAGTCAGCCTGGCAGTGCCTAGTCCCGTCT
CTCTTGCTGCACTAGAGAACCCCATGAGACAGCGTTTGTCTTATTCCTGCTGTTCTATAGACACCAATAGGGGAAACGATCTG
CACGCCAGAGGTATTGGGCTCGTCAGATTCCCACTTCTCTCGTCTGAATCGGCTGCAACGGCAGATAAATCGGGCGAAATGCT
ATAGCCCTCATAGCCCCCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTGTCAAGTCAGGTGGCTCGAGTGGCTCTCACGAAGAGCGTCACCTCGCG
CGAACAGCGCCTTCAGGCAAGATAGATCTCCCATCCTCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTAACCGAACAAATTGACTTACCGAACATC
CTCCGGACGCCAAATGCTGTCGACGGAAACGTAATCCTCTCGTCCCGCTCTTCGCTCTCACGCACTCGTGTGTTCGCGCA
CGCCGCTCATCAGGACCAACAGCTCAATGTCGGTACCCGACAATGGTAGACTCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTACTCTG
GTGACCGCTCGCTTACGCTGACCTCGGGATACTGTCCTGCAGACATCTGGAGCGCTGTCTTCCCTAGTATAATGATGTCGTCC
GCAGGTCTTGAAGACCGCTCGAGTCCCACTTGAGTTAGTAGGACCTGTTCTCCACAACCCCTTTTC

Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP (suite),
contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un
marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le
terminateur du gène sc3 (71-507)

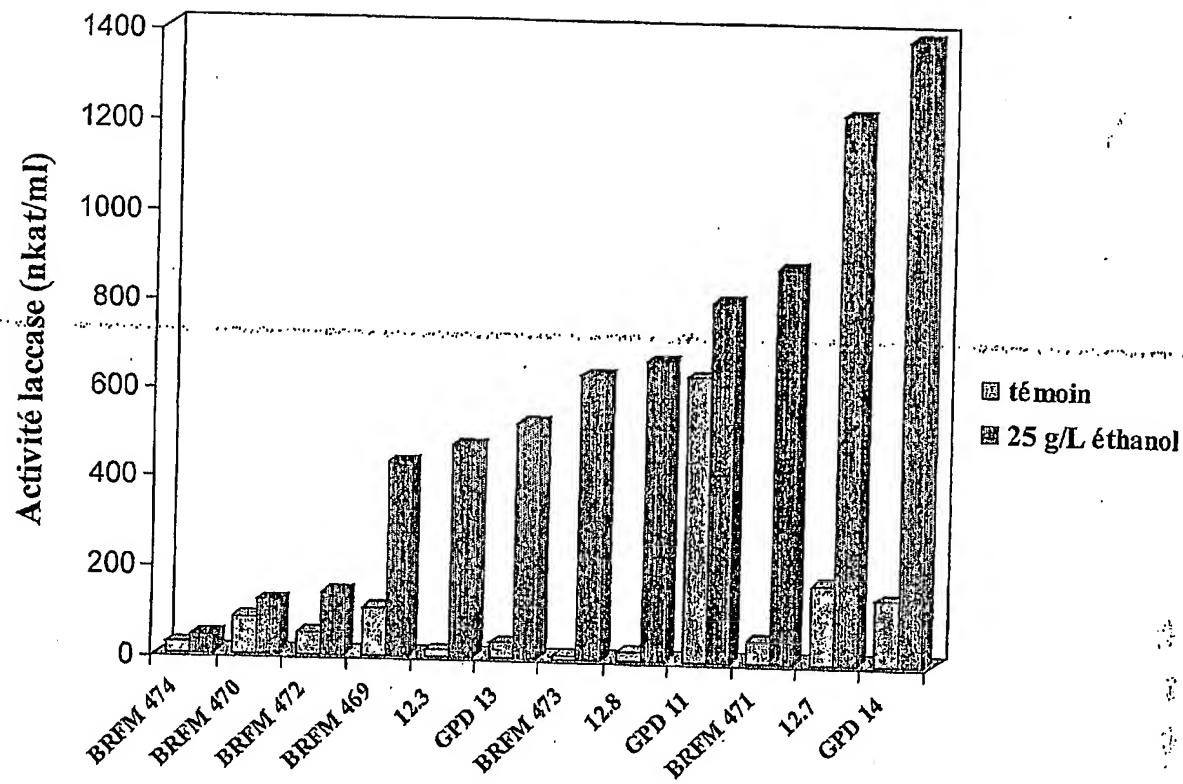


Figure 10 : Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témoins) éthanol

12/12

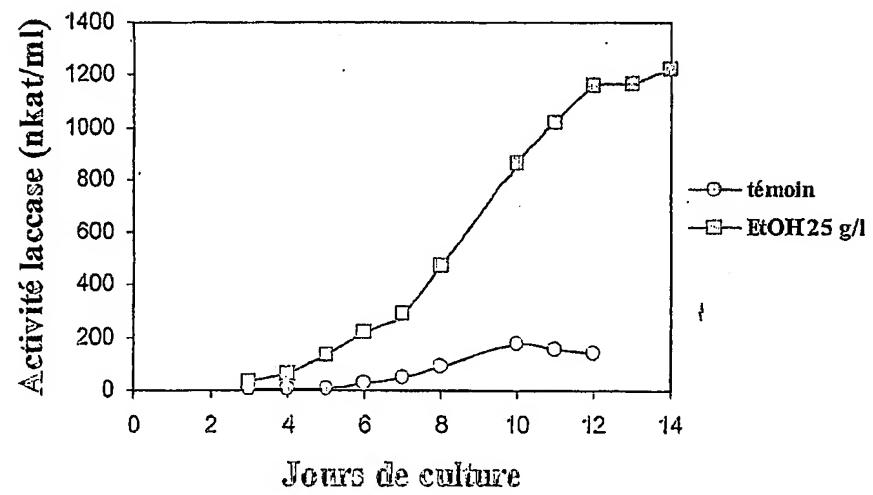
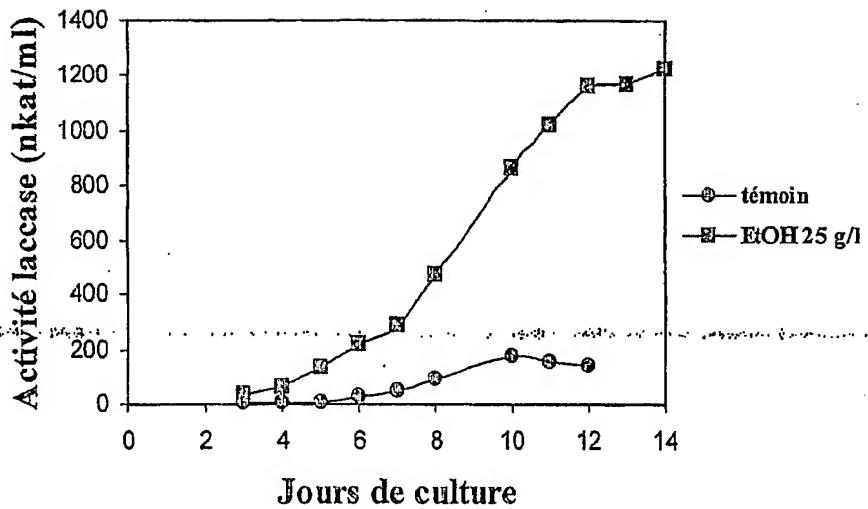


Figure 11 : Suivi des activités laccase des transformants GFP 1 et 2 sur la fonction du temps avec ou sans alcool éthylique

Ala Lys Leu Gly Pro Arg Phe Pro Phe Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile
180 185 190

Asn Gly Leu Gly Arg Thr Thr Gly Ile Ala Pro Ser Asp Leu Ala Val
195 200 205

Ile Lys Val Thr Gln Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu
210 215 220

Ser Cys Asp Pro Asn His Thr Phe Ser Ile Asp Asn His Thr Met Thr
225 230 235 240

Ile Ile Glu Ala Asp Ser Ile Asn Thr Gln Pro Leu Glu Val Asp Ser
245 250 255

Ile Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Asp Ala Ser
260 265 270

Gln Pro Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Ala Phe Gly Asn
275 280 285

Thr Gly Phe Ala Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Gly
290 295 300

Ala Pro Glu Ile Glu Pro Thr Ser Val Gln Thr Thr Pro Thr Lys Pro
305 310 315 320

Leu Asn Glu Val Asp Leu His Pro Leu Ser Pro Met Pro Val Pro Gly
325 330 335

Ser Pro Glu Pro Gly Gly Val Asp Lys Pro Leu Asn Leu Val Phe Asn
340 345 350

Phe Asn Gly Thr Asn Phe Phe Ile Asn Asp His Thr Phe Val Pro Pro
355 360 365

Ser Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln
370 375 380

Asp Leu Val Pro Glu Gly Ser Val Phe Val Leu Pro Ser Asn Ser Ser
385 390 395 400

Ile Val Ile Val Ile Val Ile Val Ile Asn Ile Pro Gly Phe Pro His
395 400 405 410

Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
 . 420 . 425 430

Ser Ser Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser
 435 . . 440 . . 445

Thr Gly Gln Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Glu Thr Asn Asn
450 455 460

Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Asp Ala
465 470 475 480

Gly Phe Ala Val Val Met Ala Glu Asp Thr Pro Asp Thr Lys Ala Ala
485 490 495

Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Ile Tyr Asp Ala
500 505 510

Leu Asp Pro Ser Asp Leu
515

<210> 3
<211> 2527
<212> ADN
<213> *Pycnoporus cinnabarinus*

<400> 3
agatctccga accagaaaatg cgattgcgtt caggcccaat taagaataaa gtcgcgtcag . 60
ggcagcgacg tatottgtatcattgtac tcacccggcat cggcgtaaac accaaagcaa 120
gctcgcccc cccataggcg tgcaccggcc ggcgtgcgcc attgaggtac atgagcgggg 180
cgaaaagtccg ccattggtag ccctgtcggt gacgcgcggc gatgaaacgt ttccccat 240
tgggaagaaa cgtctgcggc ccatcatccc ttccacccat gacaaggcgg cgtcgccct 300
ttggccgcaga ggccggcggg cgacatgcac agcgaaggc acgttgcggat gggaaagcagg 360
caatcagtgg gtgtccctacg ccgcacatcg ggtcgaaaaag cgtaggcgcc ctccccataag 420
gcggcaagca tcatgtatgc ctccgattcg ggaagcctgg tgcgtatgcgt gagagactct 480
ctccgagaga ccagtgtgcg caacgttcct ggcctggaag actttaaagt gagtgtagaa 540
ggcgagcag aggacgatca tcggattgca ggaaccatcg gcattccatcg cctggaaagg 600
ttggcttttg gtagacattc gcggaaagggtg tccttagatgt gagcgggctt cttggatgtat 660
atgtcgtaa cttttctga ctcgtcggt ggtacgcattg gcaggattga gcattacggt 720
tgcctcccc ttcataaaacg ataaccctt cttcagggtt ggtcatctcc atagagcggc 780
cgctctcaa ggccttaggtt attcacaccc ttcgtcgaaac atccctattc acgggtgtctg 840

taaggaacga cttgtcatgg gatcacatga agtgcagcat actgttcgcc ggtctcgac	900
tacagacgct agtacggaa gtcgacatcc aagcgttcag tcaccacatg gcaaaaaagc	960
tgcaccatac tctttatggg gagttgtcg tgagtggat acagtcattc atgaggaaat	1020
gcccccacggg tagggtgtgg cgccccaaat attcatcgcc tggcaatagt cgatgtgcgt	1080
ccttggtaaa tgaatatcat gggtcacatg tggagacggt taaacagcgt tgactgtgaa	1140
tccctgggt gtgttggcc gaacaggtac gttgcaggaa cacaatatc tcttcggcag	1200
cccaagttctt tgcgagcggc acaggcaggc atcgcgcaac agatcccagc catccggcct	1260
ctgacattcg ggataacctga agcccttcag gtacggagcg aagaggtggg ctctctgcag	1320
cgattggcgg acggatagct gtatccctc tctcaccatt gggaaagatgt gaaaggctcc	1380
atcatatagc ggctcaactc tacctcgaat gtccaaacac ggccggaaata cttatttatg	1440
tggacaaggc cgagctatga tagttgctc ccgaagtgg taagtccgc aatctgcgt	1500
tcaggcaaca gtctcgaaa aataagaaga atattgttagg tgctgttagg cgtatcgccc	1560
aatgcgcac acacggaggc tttaggagat gaagcgcggc tgagcggtaa gggagttgg	1620
tcaccgcgc cccgaccgac tctctctt tcccagcatc atgtctcgcc gcaaacttta	1680
ccctctattt accaactcca cgagaaagca ggaacagctt ccttgcgtct catgacgtcc	1740
gcaatccaga cccttagccg gttcggtact catcggttac cctgcgcgca tggtagtgga	1800
gtcagcctgg ccagtgcgtt gtcccgctc tcttgcgtca ctagagaagc cccatgagac	1860
agcgttttt gcttatttc tgctgtttct atagacacca taggggcaaa cgatcctgca	1920
cgcggcaggagg tattgggctc gtcagattcc cagttttct cctcggtctg aatcggtc	1980
acggcagata aatcgccgg aaatgctata gcccttcata gcccgcata agagtcgaa	2040
aaggcttgc agtcaggtcg gtcgagttgc tctcacatgg agcgtcaact tcgcgcgaca	2100
gccgccttcc agggcaagat agatccccc atcatccct actgcgcgtca ggcgggtac	2160
cgaacaattt acttaccgac atccctccgg acgcgcaat gctgttcgac ggaacgtaat	2220
cctttcgtc ccgcctctt tcgctctcac gcattccgtg tggttcgccgac gacggccgt	2280
catcaggacc agaccgtct caatgtctgg taccggcaca atggtgacac tgccgcaact	2340
gagtaggtct ggtcaactctg gtgcaccgtc gttacgttgc accttcggga tactgtcctg	2400
ccggccatctg gagcgcgtt ctttcccta gtataaatga tggctgtccg cagggtccctg	2460
ccggccatctg gagcgcgtt ctttcccta gtataaatga tggctgtccg cagggtccctg	2520

gctatgttgtt attgaccagc gtctgcagaa gatgggcacg acgatgcgcc gagccggcca	360
gtgtcgctcg atgtccactg ttgaggccat cctttgcta gacagacgga agagcttgg	420
agggtgcatt cctctacgaa tggttgggg cttagatgga gagtgacacg tctgagctcc	480
ccaacacgccc ttccggagg gtgcgtctcc gcggacattc acctcagtcc attgttctga	540
cctgcctaattgtataagacc ggccaacaac cttgctgacg cccatcataa cagtgccttg	600
cacagagccttccactcag tcggcgctc cctcaatcaa tcccactaac tcgcccggctc	660
tgcccccttcg ccgctcgaca cgtcgcttgg aagagccgg gcacggcgt ccgctcccc	720
cttccctccg cgtcgtcatg cacgcagcgt taatgttgct gcaggcgagc cgtaagtata	780
tgcagacttg ggtgacgata acttgaactc agacgcggcg aatgaatata caaacgcgcg	840
ggaagaaaat aatttacggg agcctccca ggtataaaag cccctcaccc gctcacttt	900
tctccagtcg aacaccccaag ttcaactacc cagcccttcc ttccctcgct atccttcytt	960
acaacacctgct cgcc	1020
	1033

<210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce PCR

<400> 6
caytggcayg grttttcc 19

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Amorce PCR

<400> 7
gagrtggaaag tcratgtgrc 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

...
... Amorce 8/17

<210> 9	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Amorce PCR	
<400> 9	
cgcagtattt cgtggagag	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Amorce PCR	
<400> 10	
gacatcttga gcgcctgtc	19
<210> 11	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Amorce PCR	
<400> 11	
atcgaaggtt ccgatgactg acatgac	27
<210> 12	
<211> 5122	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Séquence du vecteur pEGT	
<400> 12	
catggatat cgcatgcctt cagagctcta gagtcgacgg gcccggtaacc gccccggcct	60
taagacgcgt ggatccgcag gtgaacgcgc ctatcggtgg gatattcggg cgacgggagc	120
ctcggcaatc tgagccttgt tactgccttag caaaattcgga atcccttcga tgtcataggg	180
tccggacaa gtgatcgct tgctacatac tccaagggtgt tgactcattc cctcgataat	240
gaacattgtt gtttgtttt gttctctatc cgctcagtca cgccgacccca cacgtgcatt	300
gttgaacttc gccacgcAAC aaccgcattttt cggatggcg aacctaagta aaggctgagt	360
cgtggactaa agcactccac tttacggcga ggatgccagt ctacgtcatg aatgaaggct	420

acgctcaagt cagagggtggc gaaaccgcac aggactataa agataccagg cgtttccccc	2340
tggaaagctcc ctctgtcgct ctccctgttcc gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc	2400
ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatacgctca cgctgttaggt atctcagttc	2460
ggttaggttc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg	2520
ctgcgcctta tccggtaact atcgcttga gtccaaacccg gtaagacacg acttatcgcc	2580
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgttaggcg gtgctacaga	2640
gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc	2700
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac	2760
caccgctggt agcggtggtt ttttttttgc caagcagcag attacgcgc gaaaaaaaaagg	2820
atctcaagaa gatcctttaa tcttttctac ggggtctgac gctcagtggc acgaaaactc	2880
acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa	2940
ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagttt	3000
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc acgcgatctgt ctatttcgtt catccatagt	3060
tgcctgactc cccgtcggt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggcccccag	3120
tgtgcataatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca	3180
gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcact ttatccgcct ccatccagtc	3240
tattaattgt tgccggaaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt	3300
tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgctg ttggatgg cttcattcag	3360
ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtca aaaaagcggt	3420
tagctccttc ggtccctccga tcgttgtcag aagtaagttt gcccgcgtt tatcactcat	3480
ggttatggca gcactgcata attctttac tgcgtatgcct tccgttaagat gctttctgt	3540
gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc	3600
ttgccccggcg tcaatacggg ataataccgc gcccacatgc agaactttaa aagtgcctat	3660
cattggaaaa cgttcttcgg ggccaaaaact ctcaaggatc ttaccgtgt tgagatccag	3720
ttcgatgtaa cccactcggt cacccaaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcg	3780
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggaaaa tgccgcaaaa aaggaaataa gggcgacacg	3840
gaaatgttga atactcatac tcttccttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta	3900
ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaacaaa taggggttcc	3960
gcgcacattt ccccgaaaaag tgccacactga cgtctaagaa accatttatta tcatgacatt	4020
aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctccgtctc gcgcgttgc gtgatgacgg	4080

tggaaaaccc	tgacacatgc	agctccccga	gacggtcaca	gcttgtctgt	aagcggatgc	4140
cgggagcaga	caagcccgta	agggcgcgta	agcgggtgtt	ggcgggtgtc	ggggctggct	4200
taactatgcg	gcatcagagc	agattgtact	gagagtgcac	catatgcggt	gtgaaataacc	4260
gcacagatgc	gtaaggagaa	aataccgcat	caggcgccat	tcgcccattca	ggctgcgcaa	4320
ctgtttggaa	gggcgatcgg	tgcgggcctc	ttcgctatta	cgccagctgg	cgaaaggggg	4380
atgtgctgca	aggcgattaa	gttgggtaac	gccagggttt	tcccagtac	gacgttgtaa	4440
aacgacggcc	agtgc当地	ttgcatgcct	gcaggtcgac	gaccgagcgc	gcccaccca	4500
gcctatcccg	cgcgggtcgg	gacccaaaaat	aagcgggccc	cgcgcgcgc	cgtcggcga	4560
cggggtgtat	ctacgaacgg	aactgggagg	cgactcgaa	gagtttggtt	agaaaggggg	4620
acaccatcgc	ggacggccca	gtgtctggd	cagctgagcg	tgcattgtgt	tcaattctga	4680
cctgtggcat	gtaaggaaacg	tgctcggat	cgaggggtgg	cgcgagagcc	tcttcgggt	4740
gagattagta	actgtactgc	gaagccgcgg	aggggttagg	atgagaggt	gacagggtcg	4800
cagcccaggt	gcgagaagga	ctgcgaagga	ctgttcttcg	accgcgcacc	tgcaattgcg	4860
cgcataggata	aatagagcg	tcgcctcga	ggggactcg	accagggtcg	gtggtggcgc	4920
ccgacgggac	tggctggca	tttgcagatg	gcgcgcagtc	caggccgcgg	ccgatgtgtt	4980
catcccgaaa	tgtcagtatc	gatcgatct	ttcgggcgtg	ggtataaaag	cgcgcgcacc	5040
gccgtctccc	tctttctcca	gcactccat	ccagagcact	tccctctccc	atcgcatccc	5100
atcacacaat	aatgcccatac	ac				5122

<210> 13
<211> 5490
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Séquence du vecteur pESC

<400>	13					
agcttctccg	gccccgaatc	gaacggcagg	atgtgtggc	gtgtccaata	ttgccatgaa	60
aatctgtcag	aagtgagccc	tctcgtaacc	ctgtacagct	tcgctgagtt	gaaaagcagg	120
gttcatcttq	ggctcactga	tgactgagc	tcgaccggag	aactaaatga	ccagccggag	180
tgttcaactaa	cttaacgcgg	ggtattcagg	gcagcttctc	tatgttgcgc	ctacgacgta	240
getcaccgccc	catgaacggg	ggaaacgggg	aggggtcggt	tgggtacgtc	tttacgttgc	300
gttctttttt	atccacccgc	gttctttttt	gttctttttt	gttctttttt	gttctttttt	360
..

catctggccc cagtgcgtca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat	4200
cagcaataaaa ccagccagcc ggaaggggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg	4260
cctccatcca gtcttataat tggccgggg aagcttagat aagtagttcg ccagttaata	4320
gtttgcgcaa cggtgttgcc attgctacag gcacgttgt gtcacgctcg tcgtttggta	4380
tggcttcatt cagctccggc tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt	4440
gcaaaaaaagc ggttagctcc ttccggtcctc cgatcggtgt cagaagtaag ttggccgcag	4500
tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccattccgtaa	4560
gatgcttttc tgtgacttgtt gaggactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc	4620
gaccgagttg ctcttgcggc gcgtcaatac gggataatac cgccgcacat agcagaactt	4680
taaaagtgtt catcatttggaa aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc	4740
tgtttagatc cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcattttta	4800
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaaggaa	4860
taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct tttcaatat tattgaagca	4920
tttatcaggg ttattgtotc atgagcggat acatatttga atgtattttag aaaaataaac	4980
aaataggggt tccgcgcaca ttccccgaa aagtgcacc tgacgtctaa gaaaccattta	5040
ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gcccttcgt ctcgcgcgtt	5100
tcgggtatga cggtaaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc	5160
tgttaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt	5220
gtcggggctg gcttaactat gcggcatca gacagattgt actgagatgt caccatatgc	5280
ggtgtgaaat accgcacaga tgcgttaagga gaaaataccg catcaggcgc cattcgccat	5340
tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggtgccggc ctctcgcta ttacgccagc	5400
tggcgaaagg gggatgtgtc gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg tttcccaagt	5460
cacgacgttg taaaacgacg gccagtgcca	5490

reçue le 16/02/04



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1 / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)	IFB 03 DH INR ORUS		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0400366		
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DETERMINEE PAR DES SOUCHE MONOCARYOTIQUES DE <i>P. CINNABARINUS</i>			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147, rue de l'Université, 75338 PARIS CEDEX 07, FRANCE UNIVERSITE DE PROVENCE 3, Place Victor Hugo, F-13331 MARSEILLE CEDEX 3, FRANCE BIOMADE TECHNOLOGY FOUNDATION Nijenborgh 4, NL-9747 AG GRONINGEN, PAYS-BAS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		ALVES	
Prénoms		Alexandra	
Adresse	Rue	Hemsterhuislaan 30,	
	Code postal et ville	9752	NE HAREN - Pays Bas
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		RECORD	
Prénoms		Eric	
Adresse	Rue	La Chloris, D, 13, boulevard du Redon	
	Code postal et ville	13009	MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LOMASCOLO	
Prénoms		Anne	
Adresse	Rue	Le Clos de la Bastide, B, 42, traverse le Mée	
	Code postal et ville	13008	MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S)		Paris le 16 FÉVRIER 2004	
DU (DES) DEMANDEUR(S)			
DU (DES) INVENTEUR(S)			
DU (DES) EXPERT(S) OU AVOCAT(E)		DU (DES) EXPERT(S) OU AVOCAT(E)	



reçue le 16/02/04

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235'02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 . 2 ..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)	IFB 03 DH INR ORUS	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0400366	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DETERMINEE PAR DES SOUCHE MONOCARYOTIQUES DE <i>P. CINNABARINUS</i>		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147, rue de l'Université, 75338 PARIS CEDEX 07, FRANCE UNIVERSITE DE PROVENCE 3, Place Victor Hugo, F-13331 MARSEILLE CEDEX 3, FRANCE BIOMADE TECHNOLOGY FOUNDATION Nijenborgh 4, NL-9747 AG GRONINGEN, PAYS-BAS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» Si'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom	SIGOILLOT	
Prénoms	Jean-Claude	
Adresse	Rue	Résidence Anémones Florales, 500, avenue Joseph Raynaud.
Code postal et ville	83140	SIX FOURES LES PLAGES
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom	ASTHER	
Prénoms	Marcel	
Adresse	Rue	28, avenue Peymian
Code postal et ville	13600	LA CIOTAT
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom	WÖSTEN	
Prénoms	Han A.B.	
Adresse	Rue	C. Huygenslaan 19
Code postal et ville	3705	SN ZEIST - Pays-Bas
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)	Paris, le 15 JANVIER 2004 Charles DEMACHY, Mandataire 422.5/PP170	